

Untersuchungen zur Wirkungsweise
der Hyaluronidasehemmung durch
Oestransulfat

von

ALOIS GLÜCK

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen zur Wirkungsweise der Hyaluronidasehemmung
durch Oestroneulfat

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Alois Glück
aus
Kühbach /Obb.
1959

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung: 16. VI. 59

Inhaltsverzeichnis

Problematik	4
Eigene Untersuchungen	6
Methodik	6
Versuchsreihen	7
Statistische Auswertung	11
Diskussion	20
Zusammenfassung	20
Literaturverzeichnis	22

Problematik

Mathies¹⁻⁸ und Mitarbeiter⁹⁻¹³ haben zeigen können, daß die größte Anzahl der in vivo hyaluronidasehemmend wirksamen Substanzen einen über das Nebennierenmark laufenden Wirkungsmechanismus besitzen. Im einzelnen haben sie am Beispiel der Salicylate, des Phenylbutazons, des Chloraethylbenzmethoxazons, der Nebennierenrindensteroiden und der Moorbäder nachweisen können, daß ihre hyaluronidasehemmende Wirkung bei adrenaletomierten Ratten ausbleibt, bei hypophysektomierten Tieren dagegen erhalten ist. Dieses Verhalten ließ vermuten, daß die Nebenniere eine Rolle im Wirkungsablauf hyaluronidasehemmender Substanzen spielt. Zunächst glaubte man wohl an eine Nebennierenrindentätigkeit, besonders im Zusammenhang mit der Annahme einer über die Nebennierenrinde laufenden Tätigkeit der antirheumatischen Substanzen, die, soweit bisher untersucht, ausnahmslos hyaluronidasehemmend wirksam sind. Nach Versuchen von Domenjoz¹⁴, Mathies⁸ und Jung¹⁵ hat sich aber gezeigt, daß unter den geprüften hyaluronidasehemmenden Substanzen die bei intakten Ratten sichtbare Ascorbinsäureabnahme der Nebenniere bei hypophysektomierten Ratten ausbleibt. Wie bereits erwähnt, ist jedoch bei hypophysektomierten Ratten die hyaluronidasehemmende Wirkung erhalten, obwohl die Ascorbinsäure-Depletion, die als Ausdruck der inkretorischen Aktivität der Nebennierenrinde angesehen werden muß (Sayers und Sayers¹⁶), ausbleibt. Diese Versuchsergebnisse besagen, daß die Aktivierung der Nebennierenrinde durch die hyaluronidasehemmenden Substanzen über die Hypophyse läuft, jedoch für die hyaluronidasehemmende Wirkung der Substanzen keine Bedeutung besitzt. Da aber andererseits die Anwesenheit der Nebenniere für den hyaluronidasehemmenden Effekt erforderlich zu sein scheint, blieb nur anzunehmen, daß hier eine über das Nebennierenmark laufende Wirkung vorliegt. Diese Vermutung wurde durch Arbeiten von Mathies^{1,17,18}, Mathies und Jankowski³, Jankowski⁹, und Scheufele¹ gestützt, nach denen die Nebennierenmarkkatecholamine Adrenalin und Noradrenalin auch bei adrenaletomierten Tieren eine Hyaluronidasehemmung gleicher Größenordnung hervorrufen. Ferner konnten Mathies^{8,20}, Schmidt²¹, Vogel²², Poulantzas²³ und

L i n g n a u ²⁴ zeigen, daß die Hyaluronidasehemmung durch Natrium-salicylat, Phenylbutazon, Prednisolon und Moorbäder ausbleibt, wenn vorher Ergotamintartrat als Adrenolyticum injiziert wurde. Weiter konnten nach Untersuchungen von M a t h i e s ¹⁸ und S c h e u f e l e ¹⁹ angenommen werden, daß der hyaluronidasehemmende Effekt, der durch Adrenalin bzw. Noradrenalin ausgelöst wird, nicht während der primären Wirkungsphase auf die Pupillenreaktion zustandekommt, sondern erst nach Abklingen dieser Wirkung sichtbar wird. Dabei tritt die hyaluronidasehemmende Wirkung der Katecholamine nach Untersuchungen von M a t h i e und S c h l i e r f ²⁶ nicht in einem zeitlichen Abhängigkeitsverhältnis vom Beginn der Katecholaminwirkung auf, sondern ist an den Abfall eines erhöhten Blutspiegelniveaus auf ein niedrigeres gebunden. Es war nach diesen Feststellungen anzunehmen, daß im Anschluß an eine Katecholaminwirkung ein weiterer Faktor oder eine Kette von Faktoren in Tätigkeit gesetzt wird, die letztlich die Hyaluronidasehemmung bedingt. Da vom Heparin eine Hyaluronidasehemmung bekannt war, wurde diese Substanz im Hinblick auf ihre Hyaluronidasehemmung in vivo untersucht. Hierbei haben M a t h i e s und W a l c h e r ²⁷ sowie M a x e i n ²⁸ feststellen können, daß Heparin auch bei adrenaletomierten Ratten eine Hyaluronidasehemmung hervorruft, die durch vorherige Gabe von Protaminsulfat als heparininaktivierender Substanz aufgehoben werden kann. Allerdings ist das Ausmaß der Hyaluronidasehemmung bei adrenaletomierten Ratten geringer als es bei intakten Tieren der Fall ist. Durch das Adrenolyticum Ergotamintartrat ist die Hyaluronidasehemmung durch Heparin nicht aufzuheben, obwohl auch hier der hyaluronidasehemmende Effekt etwas geringer zu werden scheint. Es kann noch nicht gesagt werden, wodurch die Verringerung der hyaluronidasehemmenden Wirkung des Heparin zustandekommt, es muß jedoch zusammenfassend festgestellt werden, daß die Hyaluronidasehemmung des Heparin durch Ergotamintartrat nicht aufzuheben ist, daß der hyaluronidasehemmende Effekt jedoch durch Protaminsulfat blockiert werden kann. Durch diese Untersuchungsergebnisse rückte eine Beteiligung des Heparin am Wirkungsablauf der hyaluronidasehemmenden wirksamen Substanzen in den Bereich der Möglichkeiten.

Es wurde bereits festgestellt, daß nicht nur die hyaluronidasehemmenden chemischen Substanzen wie Salicylate, Chloraethylbenzmethoxazon und auch die Moorbäder mit den im Moor enthaltenen, noch nicht näher bekannten hyaluronidasehemmenden wirksamen Stoffe, eine über das Nebennierenmark

laufende Wirkung entfalten, sondern daß dieses auch bei den Nebennierenrindenhormonen der Fall ist. Dagegen zeigte das Heparin eine vom Nebennierenmark unabhängige Wirkung. Es sollte in der vorgelegten Arbeit eine weitere körpereigene Substanz untersucht werden, von der eine hyaluronidasehemmende Wirkung bereits bekannt ist, und zwar die Oestrogene, deren hyaluronidasehemmender Effekt von Schoen²⁹, Wattenberg³⁰, Koch³¹, Heim³², Sprunt^{33,34} und Mitarbeiter und Obal³⁵ bereits beschrieben wurde. Da sich nach den oben angeführten Versuchen gezeigt hat, daß sich der hyaluronidasehemmende Effekt der über das Nebennierenmark wirkenden Substanzen durch Ergotamintartrat blockieren läßt, war zu untersuchen, ob dieses auch bei den Oestrogenen der Fall ist. Gleichzeitig war zu prüfen, ob der hyaluronidasehemmende Effekt der Oestrogene durch Protaminsulfat zu blockieren ist. Als Versuchssubstanz wurde das Oestronsulfat (Schering A.G.) gewählt, das in wasserlöslicher Form vorliegt und deshalb eine bequeme subcutane Injektion gestattet. Daneben wurde Aqua dest. in gleicher Gesamtinjektionsflüssigkeit injiziert, um einen Injektionseffekt ausschließen zu können.

Eigene Untersuchungen

Methodik

Es wurden männliche weiße Ratten für die Versuche verwendet. Die Hyaluronidaseaktivität wurde an der Ausbreitung einer Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor und zu verschiedenen Zeiten nach der Oestronsulfat-Injektion ermittelt. Hierzu wurde die Bauchhaut 48 Stunden vor dem Versuch mit Pilca enthaart. Die reine Farbstoffquaddel wurde mit 0,1 ccm einer 0,6%igen Evansblau-Lösung streng intracutan gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff+Hyaluronidase-Lösung wurden in 2 ccm der oben genannten Farbstofflösung 150 IE Hyaluronidase (Kinetin, Schering A.G.) gelöst, so daß bei der intracutanen Injektion von 0,1 ccm 7,5 IE Hyaluronidase zur Wirkung kamen. Ausgewertet wurde die 10 Minuten nach Injektion erreichte Ausbreitung der Farbstoff-Flecken. Diese wurden durch Übertragung der Konturen auf Zelluloidstreifen und anschließende planimetrische Ausmessung bestimmt. Die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zeigt eine weit raschere Ausbreitung als die alleinige Farbstoffquaddel, dagegen weist die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel nach Gabe einer hyaluronidasehemmenden Substanz eine Hemmung der Ausbreitung auf. Die Ver-

L i n g n a u ²⁴ zeigen, daß die Hyaluronidasehemmung durch Natrium-salicylat, Phenylbutazon, Prednisolon und Moorbäder ausbleibt, wenn vorher Ergotamintartrat als Adrenolyticum injiziert wurde. Weiter konnte nach Untersuchungen von M a t h i e s ¹⁸ und S c h e u f e l e ¹⁹ angenommen werden, daß der hyaluronidasehemmende Effekt, der durch Adrenalin bzw. Noradrenalin ausgelöst wird, nicht während der primären Wirkungsphase auf die Pupillenreaktion zustandekommt, sondern erst nach Abklingen dieser Wirkung sichtbar wird. Dabei tritt die hyaluronidasehemmende Wirkung der Katecholamine nach Untersuchungen von M a t h i e s ²⁵ und S c h l i e r f ²⁶ nicht in einem zeitlichen Abhängigkeitsverhältnis vom Beginn der Katecholaminwirkung auf, sondern ist an den Abfall eines erhöhten Blutspiegelniveaus auf ein niedrigeres gebunden. Es war nach diesen Feststellungen anzunehmen, daß im Anschluß an eine Katecholaminwirkung ein weiterer Faktor oder eine Kette von Faktoren in Tätigkeit gesetzt wird, die letztlich die Hyaluronidasehemmung bedingt. Da vom Heparin eine Hyaluronidasehemmung bekannt war, wurde diese Substanz im Hinblick auf ihre Hyaluronidasehemmung in vivo untersucht. Hierbei haben M a t h i e s und W a l c h e r ²⁷ sowie M a x e i n ²⁸ feststellen können, daß Heparin auch bei adrenaletomierten Ratten eine Hyaluronidasehemmung hervorruft, die durch vorherige Gabe von Protaminsulfat als heparininaktivierender Substanz aufgehoben werden kann. Allerdings ist das Ausmaß der Hyaluronidasehemmung bei adrenaletomierten Ratten geringer als es bei intakten Tieren der Fall ist. Durch das Adrenolyticum Ergotamintartrat ist die Hyaluronidasehemmung durch Heparin nicht aufzuheben, obwohl auch hier der hyaluronidasehemmende Effekt etwas geringer zu werden scheint. Es kann noch nicht gesagt werden, wodurch die Verringerung der hyaluronidasehemmenden Wirkung des Heparin zustandekommt, es muß jedoch zusammenfassend festgestellt werden, daß die Hyaluronidasehemmung des Heparin durch Ergotamintartrat nicht aufzuheben ist, daß der hyaluronidasehemmende Effekt jedoch durch Protaminsulfat blockiert werden kann. Durch diese Untersuchungsergebnisse rückte eine Beteiligung des Heparin am Wirkungsablauf der hyaluronidasehemmend wirksamen Substanzen in den Bereich der Möglichkeiten.

Es wurde bereits festgestellt, daß nicht nur die hyaluronidasehemmenden chemischen Substanzen wie Salicylate, Chloraethylbenzmethoxazon und auch die Moorbäder mit den im Moor enthaltenen, noch nicht näher bekannten hyaluronidasehemmend wirksamen Stoffe, eine über das Nebennierenmark

laufende Wirkung entfalten, sondern daß dieses auch bei den Nebennierenrindenhormonen der Fall ist. Dagegen zeigte das Heparin eine vom Nebennierenmark unabhängige Wirkung. Es sollte in der vorgelegten Arbeit eine weitere körpereigene Substanz untersucht werden, von der eine hyaluronidasehemmende Wirkung bereits bekannt ist, und zwar die Oestrogene, deren hyaluronidasehemmender Effekt von Schoen²⁹, Wattenberg³⁰, Koch³¹, Heim³², Sprunt^{33,34} und Mitarbeiter und Obal³⁵ bereits beschrieben wurde. Da sich nach den oben angeführten Versuchen gezeigt hat, daß sich der hyaluronidasehemmende Effekt der über das Nebennierenmark wirkenden Substanzen durch Ergotamintartrat blockieren läßt, war zu untersuchen, ob dieses auch bei den Oestrogenen der Fall ist. Gleichzeitig war zu prüfen, ob der hyaluronidasehemmende Effekt der Oestrogene durch Protaminsulfat zu blockieren ist. Als Versuchssubstanz wurde das Oestransulfat (Schering A.G.) gewählt, das in wasserlöslicher Form vorliegt und deshalb eine bequeme subcutane Injektion gestattet. Daneben wurde Aqua dest. in gleicher Gesamtinjektionsflüssigkeit injiziert, um einen Injektionseffekt ausschließen zu können.

Eigene Untersuchungen

Methodik

Es wurden männliche weiße Ratten für die Versuche verwendet. Die Hyaluronidaseaktivität wurde an der Ausbreitung einer Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor und zu verschiedenen Zeiten nach der Oestransulfat-Injektion ermittelt. Hierzu wurde die Bauchhaut 48 Stunden vor dem Versuch mit Pilca enthaart. Die reine Farbstoffquaddel wurde mit 0,1 ccm einer 0,6%igen Evansblau-Lösung streng intracutan gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff+Hyaluronidase-Lösung wurden in 2 ccm der oben genannten Farbstofflösung 150 IE Hyaluronidase (Kinetin, Schering A.G.) gelöst, so daß bei der intracutanen Injektion von 0,1 ccm 7,5 IE Hyaluronidase zur Wirkung kamen. Ausgewertet wurde die 10 Minuten nach Injektion erreichte Ausbreitung der Farbstoff-Flecken. Diese wurden durch Übertragung der Konturen auf Zelluloidstreifen und anschließende planimetrische Ausmessung bestimmt. Die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zeigt eine weit raschere Ausbreitung als die alleinige Farbstoffquaddel, dagegen weist die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel nach Gabe einer hyaluronidasehemmenden Substanz eine Hemmung der Ausbreitung auf. Die Ver-

suche wurden in Narkose mit 30 mg Evipan-Natrium/100 g Tier durchgeführt. Ein Einfluß von Barbituraten auf die Aktivität der Hyaluronidase besteht nach W i l h e l m i ³⁶ nicht.

Versuchsreihe 1

Bei diesen Versuchen wurde den Tieren 50 γ Oestronsulfat/100 g Tier subcutan injiziert und die Hyaluronidasehemmung nach der oben angegebenen Methodik 10, 30 und 50 Minuten nach Injektion bestimmt. Die Versuchsergebnisse finden sich in Tabelle 1.

Versuchsreihe 2

In dieser Versuchsreihe wurde weiteren Ratten ebenfalls 50 γ Oestronsulfat/100 g Tier s.c. appliziert und die Hyaluronidasehemmung 20, 40 und 60 Minuten nach der Injektion ermittelt. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 aufgezeichnet.

Versuchsreihe 3

Da 50 Minuten nach Oestronsulfatinjektion die stärkste Hyaluronidasehemmung gemessen wurde, wurde zum gleichen Zeitpunkt nach einer Aqua bidest.-Injektion die Hyaluronidasehemmung bestimmt. Es wurde 1 ccm Aqua bidest. subcutan injiziert, da in dieser Gesamtflüssigkeitsmenge auch die Oestronsulfatdosis appliziert worden war. Das Ergebnis (Tabelle 3) zeigt, daß die Hyaluronidasehemmung nicht Folge eines Injektionsstress sein kann.

Versuchsreihe 4

Es wurde den Ratten 0,5 mg Ergotamintartrat/10⁰ g Tier (Gynergen, Sandoz A.G.) subcutan, 30 Minuten danach 50 γ Oestronsulfat/100 g Tier, ebenfalls subcutan injiziert. Die Hyaluronidasehemmung wurde 20 und 50 Minuten nach der Oestronsulfat-Injektion bestimmt. Die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, daß die Hyaluronidasehemmung durch Oestronsulfat praktisch blockiert werden kann, wenn vorher Ergotamintartrat appliziert wird.

Versuchsreihe 5

Bei diesen Versuchen wurde den Ratten 1,5 mg Protaminsulfat/Tier i.v. gegeben und im unmittelbaren Anschluß danach wieder 50 γ Oestronsulfat/100 g Tier. Die Messung der Hyaluronidasehemmung erfolgte ebenfalls 20 und 50 Minuten nach der Oestronsulfat-Injektion. Auch bei dieser Versuchsreihe zeigte sich, daß die Hyaluronidasehemmung nach Oestronsulfat durch Protaminsulfat blockiert werden kann und daß sogar eine ge-

Film Nr.	Qu. Nr.	Gewicht in g	Farbstoffquaddel vor 10'nach 30'nach 50'nach 50 μ Oestronsulfat/100 g Tier s.c.				Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vor 10'nach 30'nach 50'nach 50 μ Oestronsulfat/100 g Tier s.c.			
I	1	205	184 mm ²	164 mm ²	164 mm ²	184 mm ²	272 mm ²	232 mm ²	224 mm ²	208 mm ²
I	2	265	176 mm ²	180 mm ²	172 mm ²	176 mm ²	288 mm ²	228 mm ²	240 mm ²	224 mm ²
I	3	225	180 mm ²	168 mm ²	196 mm ²	176 mm ²	284 mm ²	228 mm ²	220 mm ²	216 mm ²
I	4	215	172 mm ²	176 mm ²	180 mm ²	172 mm ²	276 mm ²	230 mm ²	224 mm ²	212 mm ²

Tabelle 1
(Versuchsreihe 1)

Film Nr.	Qu. Nr.	Gewicht in g	Farbstoffquaddel vor 20'nach 40'nach 60'nach 50 μ Oestronsulfat/100 g Tier s.c.				Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vor 20'nach 40'nach 60'nach 50 μ Oestronsulfat/100 g Tier s.c.			
II	1	235	180 mm ²	168 mm ²	176 mm ²	168 mm ²	268 mm ²	244 mm ²	246 mm ²	260 mm ²
II	2	265	184 mm ²	188 mm ²	160 mm ²	180 mm ²	284 mm ²	240 mm ²	204 mm ²	276 mm ²
II	3	195	188 mm ²	184 mm ²	184 mm ²	184 mm ²	272 mm ²	220 mm ²	208 mm ²	264 mm ²
II	4	225	176 mm ²	180 mm ²	168 mm ²	172 mm ²	276 mm ²	228 mm ²	212 mm ²	268 mm ²

Tabelle 2
(Versuchsreihe 2)

Film Nr.	Qu. Nr.	Gewicht in g	Farbstoff-Quaddel vor 50'nach 1 cem Aqua bidest./100 g Tier s.c.	Farbstoff+Hyase-Quaddel vor 50'nach 100 g Tier s.c.	
III	1	235	180 mm ²	188 mm ²	276 mm ²
III	2	205	176 mm ²	180 mm ²	272 mm ²
III	3	195	172 mm ²	176 mm ²	288 mm ²
III	4	220	184 mm ²	172 mm ²	284 mm ²

T a b e l l e 3
(Versuchsreihe 3)

Film Nr.	Qu. Nr.	Gewicht in g	Farbstoff-Quaddel vor 20'nach		50 μ Oestronsulfat/100g s.c., dieses		50'nach		Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor 20'nach 50'nach		50 μ Ergotamintartrat/100g	
II	1	250	192 mm ²	180 mm ²	180 mm ²	280 mm ²	272 mm ²	284 mm ²	2	2	2	2
II	2	210	160 mm ²	172 mm ²	181 mm ²	280 mm ²	280 mm ²	276 mm ²	2	2	2	2
II	3	200	200 mm ²	208 mm ²	192 mm ²	272 mm ²	260 mm ²	271 mm ²	2	2	2	2
II	4	200	188 mm ²	184 mm ²	188 mm ²	276 mm ²	268 mm ²	268 mm ²	2	2	2	2

T a b e l l e 4
(Versuchsreihe 4)

Film Nr.	Qu. Nr.	Gewicht in g	Farbstoff-Quaddel vor 20'nach		1,5 mg Protaminsulfat i.v./Tier, sofort darauf		50 μ Oestronsulfat/100 g s.c.		Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor 20'nach 50'nach	
I	1	175	164 mm ²	148 mm ²	168 mm ²	288 mm ²	272 mm ²	272 mm ²	2	2
I	2	185	144 mm ²	132 mm ²	164 mm ²	236 mm ²	244 mm ²	280 mm ²	2	2
I	3	180	152 mm ²	164 mm ²	164 mm ²	238 mm ²	240 mm ²	260 mm ²	2	2
I	4	175	152 mm ²	156 mm ²	160 mm ²	272 mm ²	264 mm ²	292 mm ²	2	2

T a b e l l e 5
(Versuchsreihe 5)

wisse Steigerung der Hyaluronidaseaktivität sichtbar wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgezeichnet.

Berechnung und statistische Auswertung

Die Hyaluronidasehemmung wurde in Prozenten angegeben. Zur Berechnung wurde angenommen, daß die Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddel vor der Injektion einer 100%igen Hemmung (eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel mit vollständig gehemmter Hyaluronidaseaktivität hätte die gleiche Größe), und diejenige der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor der Oestronsulfat-Injektion einer 0%igen Hemmung entspricht. Unter Zugrundelegung dieser beiden Festpunkte wurde aus der Ausbreitung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel nach Oestronsulfat-Applikation die prozentuale Hyaluronidasehemmung durch hyaluronidasehemmende Stoffe errechnet. Die Farbstoffquaddel nach Oestronsulfat-Applikation diente zur Feststellung, inwieweit das Oestronsulfat auf die Ausbreitung einer Quaddel ohne Hyaluronidasebeigabe einen Einfluß ausübt.

Hinsichtlich der Farbstoff-Quaddeln lag allen Versuchsreihen die biologische Hypothese zugrunde, daß diese Farbstoff-Quaddeln im Verlaufe der Versuche nur zufällige, jedoch nicht wesentliche, durch etwaige Medikation oder sonstige Ursachen bedingte Änderungen erfahren. Hinsichtlich der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel lag bei den Versuchsreihen 3, 4 und 5 ebenfalls die biologische Hypothese zugrunde, daß diese im Verlaufe der Versuche nur zufällige, jedoch nicht wesentliche Änderungen erfahren, d.h. daß sie sich im wesentlichen ebenso verhalten wie die zugehörigen reinen Farbstoffquaddeln. Die Versuchsreihen 1 und 2 hingegen sollten zeigen, in welcher Weise die Hyaluronidase-Tätigkeit durch die Gabe von Oestronsulfat beeinflußt wird.

Entsprechend den biologischen Hypothesen erfolgte die statistische Auswertung. Zugrundegelegt wurde jeweils ein lineares Modell, bei dem wir annahmen, daß etwaige Änderungen des Flächeninhaltes der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln nur von dem Zeitpunkt, jedoch nicht von den jeweiligen Tieren abhängen. Entsprechend diesem linearen Modell wandten wir zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse Varianzanalysen an. Die jeweilige Form dieser Varianzanalysen richtete sich nach der biologischen Hypothese, die zu prüfen war.

Bei den Versuchsreihen 3, 4 und 5 war zu prüfen, ob es zulässig ist,

anzunehmen, daß sich die reine Farbstoffquaddel und die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel während des gesamten Versuchablaufes gleichartig verhalten, d.h., daß sie sich während des gesamten Versuchablaufes nur um einen konstanten additiven Betrag unterscheiden, der nicht vom Zeitpunkt der Bestimmung abhängig ist. Dementsprechend wandten wir für diese Versuchsreihen jeweils dreifache Varianzanalysen an, deren Ergebnisse in der üblichen Weise in den Tabellen 8, 9 und 10 dargestellt sind. n bedeutet hierin die Zahl der Freiheitsgrade, SAQ das Summenabstandsquadrat und MAQ das mittlere Abstandsquadrat der jeweiligen Varianz. Zu prüfen war, ob eine Wechselwirkung zwischen Zeiten und Quaddeln besteht, d.h. ob der Unterschied zwischen den beiden Quaddel-Typen von der Zeit abhängig ist. Bei keiner der Versuchsreihen ist die Wechselwirkung "Zeiten-Quaddeln" größer als die Restvarianz, d.h. es besteht keinerlei Veranlassung anzunehmen, daß der Unterschied zwischen den beiden Quaddeltypen eine von der Zeit abhängige Größe ist. Es darf daher angenommen werden, daß die beiden Quaddel-Typen, abgesehen von ihrer absoluten Größe, bei diesen Versuchsreihen völlig gleichartig reagieren. Es blieb noch zu prüfen, ob die Größe beider Quaddeln sich im Verlaufe der Versuche ändert. Dieses ergibt sich aus der Größe der "Varianz zwischen den Zeiten" verglichen mit der Restvarianz. Bei den Versuchsreihen 3 und 4 ist die Varianz "Zwischen den Zeiten" zahlenmäßig kleiner als die Restvarianz, d.h. es besteht keine Veranlassung anzunehmen, daß sich die Größe der Quaddeln im Verlaufe der Versuche anders als nur zufällig ändern. Bei der Versuchsreihe 5 entgegen ist die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten zwischen der Varianz "Zwischen den Zeiten" und der Restvarianz etwas kleiner als 5%, d.h., die Quaddeln erfahren im Verlaufe des Versuches eine Änderung, die nicht mehr als zufällig angesehen werden darf. Eine genauere Untersuchung dieses Verhaltens zeigt, daß die beiden Quaddeltypen zu den Zeitpunkten 0' bzw. 20' sich nicht wesentlich ändern, während zu dem Zeitpunkt 50' nach Medikation eine Vergrößerung beider Quaddel-Typen eintritt. Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich biologisch dahingehend deuten, daß keinerlei Veranlassung vorliegt, die Hypothese zu verwerfen, die Medikation würde bei diesen Versuchsreihen keinen Einfluß auf die Ausbreitung sowohl der Farbstoff- als auch der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel ausüben. Lediglich bei der Versuchsreihe 5 scheint das Ergebnis darauf hinzudeuten, daß 50'

nach Medikation eine Vergrößerung beider Quaddel-Typen eintritt.

Bei den Versuchsreihen 1 und 2 mußte das Verhalten der Farbstoffquaddel und dasjenige der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel getrennt untersucht werden. Dementsprechend wurden je 2 Varianzanalysen durchgeführt, und zwar jeweils eine für die reine Farbstoffquaddel und eine für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel. Das Ergebnis dieser Varianzanalysen ist in den Tabellen 6 und 7 dargestellt, wobei die Bezeichnungen die gleiche Bedeutung haben wie oben. Im einzelnen ist das Ergebnis dieser Varianzanalysen wie folgt zu interpretieren:

1. Reine Farbstoff-Quaddel:

Bei keiner dieser beiden Versuchsreihen besitzt der Varianzquotient $F_{\text{emp.}}$ zwischen der "Varianz zwischen den Zeiten" und der Restvarianz bei der zugehörigen Prüfverteilung eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die kleiner als 5% ist. Es besteht somit keine Veranlassung anzunehmen, daß durch die Medikation ein von der Zeit abhängiger Einfluß auf die Größe der reinen Farbstoff-Quaddel ausgeübt wird.

2. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel:

Für diesen Quaddel-Typus besitzt in beiden Versuchsreihen der Varianzquotient $F_{\text{emp.}}$ zwischen der "Varianz zwischen den Zeiten" und der Restvarianz eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die wesentlich kleiner als 0,1% ist. Es muß daher als statistisch hoch gesichert gelten, daß die Größe der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel mit der Zeit eine Änderung erfährt, d.h., daß die Medikation einen Einfluß auf die Größe der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel besitzt.

Die Varianzanalysen machen nur eine Aussage über das generelle Verhalten, ohne nähere Angaben darüber zu machen, zwischen welchen Zeitpunkten speziell Unterschiede bestehen. Es mußte daher noch getrennt geprüft werden, zu welchen Zeitpunkten überhaupt eine gesicherte Hyaluronidasehemmung auftritt. Diese Prüfung nahmen wir mittels des von Duncan entwickelten Testes zur simultanen Prüfung mehrerer Mittelwertsdifferenzen vor. Das Ergebnis dieser Prüfungen findet sich in den Tabellen 11 und 12 in den Spalten "Sicherung". Hier ist angegeben, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit behauptet werden kann, die Abnahme der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gegenüber dem Ausgangswert vor der Medikation sei statistisch gesichert.

In den Tabellen 11-15 ist für jede Versuchsreihe der Mittelwert $\bar{x}$ aller zu dem jeweiligen Zeitpunkt bestimmten Werte, sowie deren Varianz s^2 angegeben. Die Mittelwerte sind insofern charakteristisch für das Verhalten der Tiere, als der Unterschied zwischen zwei zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmten Mittelwerten annähernd der Änderung entspricht, die auch die Werte jedes einzelnen Versuchstieres zwischen diesen 2 Zeitpunkten erfährt. Ein Vergleich zwischen den Varianzen, die zu verschiedenen Zeitpunkten gehören, gibt in gewisser Hinsicht darüber Aufschluß, in wie weit die Tiere annähernd gleichartig reagieren. Dementsprechend prüften wir mittels des Bartlett-Testes ob es zulässig ist anzunehmen, daß diese Varianzen untereinander homogen sind. Das Ergebnis des Bartlett-Testes findet sich am Fuße der jeweiligen Tabelle. n bedeutet hierin die Zahl der Freiheitsgrade der jeweiligen χ -Prüfverteilung, der die berechnete Größe $\chi^2_{\text{emp.}}$ genügt. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit p, die $\chi^2_{\text{emp.}}$ bei seiner zugehörigen Prüfverteilung zukommt, ist in keinem Fall kleiner als 5%, d.h. es besteht keine Veranlassung anzunehmen, daß die fraglichen Varianzen nicht homogen sind. Es besteht somit keine Veranlassung, die Hypothese zu verwerfen, daß Abweichungen im Verhalten der Tiere untereinander als nur zufällig bedingt sind. Inwieweit es sich hierbei um einen Effekt des geringen Stichprobenumfanges handelt, kann nicht ohne weiteres beurteilt werden.

In den Tabellen 11-15 ist außerdem die in üblicher Weise berechnete prozentuale Hyaluronidasehemmung angegeben, sofern eine solche überhaupt vorlag.

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	83	28	-	-
Zwischen Zeiten	3	99	33	-	-
Rest-Varianz	9	793	88		
Gesamt-Varianz	15	975	65		
Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	289	96	3,31	-
Zwischen Zeiten	3	9.944	3.314	114,27	0,1%
Rest-Varianz	9	258	29		
Gesamt-Varianz	15	10.491	699		

T a b e l l e 6
(Versuchsreihe 1)

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	356	119	2,48	-
Zwischen Zeiten	3	236	79	1,65	-
Rest-Varianz	9	428	48		
Gesamt-Varianz	15	1.020	68		
Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	417	139	-	-
Zwischen Zeiten	3	8.981	2.993	20,09	0,1%
Rest-Varianz	9	1.342	149		
Gesamt-Varianz	15	10.740	716		

T a b e l l e 7
(Versuchsreihe 2)

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Zeiten	1	1	1,0	-	-
Zwischen Tieren	3	59	19,7	-	-
Zwischen Quaddeln	1	41.209	41.209,0	100,00	-
Zeiten - Tiere	3	35	11,7	-	-
Zeiten - Quaddeln	1	1	1,0	-	-
Tiere - Quaddeln	3	203	67,7	1,77	-
Rest-Varianz	3	115	38,3		
Gesamt-Varianz	15	41.623	2.774,9		

T a b e l l e 8
(Versuchsreihe 3)

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	267	89	1,43	-
Zwischen Zeiten	2	37	19	-	-
Zwischen Quaddeln	1	46.994	46.994	100,00	0,1%
Tiere - Zeiten	6	198	33	-	-
Tiere - Quaddeln	3	1.289	430	6,93	2,0%
Zeiten - Quaddeln	2	67	34	-	-
Rest-Varianz	6	371	62		
Gesamt-Varianz	23	49.223	2.140		

T a b e l l e 9
(Versuchsreihe 4)

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	P
Zwischen Tieren	3	1.553	518	6,47	5,0%
Zwischen Zeiten	2	1.386	693	8,66	5,0%
Zwischen Quaddeln	1	69.338	69.338	100,00	0,1%
Tiere - Zeiten	6	927	154	1,92	-
Tiere - Quaddeln	3	1.073	358	4,47	-
Zeiten - Quaddeln	2	61	30	-	-
Rest-Varianz	6	482	80		
Gesamt-Varianz	23	74.820	3.253		

T a b e l l e 10
(Versuchsreihe 5)

	$\bar{x}$	s^2	Hyase- Hemmung	Siche- rung
Farbstoffquaddel vor	178	26		
Farbstoff+Hyase- Quaddel vor	280	53		
Farbstoffquaddel nach 10'	172	53		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 10'	229	4	48,7%	1,0%
Farbstoffquaddel nach 30'	178	187		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 30'	227	79	51,1%	1,0%
Farbstoffquaddel nach 50'	177	19		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 50'	215	47	62,6%	1,0%

n = 7;

$s^2_{emp.} = 10,920;$

p = 10%

T a b e l l e 11
(Versuchsreihe 1)

	$\bar{x}$	s^2	Hyase-Hemmung	Sicherung
Farbstoffquaddel vor	182	27		
Farbstoff+Hyase-Quaddel vor	275	46		
Farbstoffquaddel nach 20'	180	75		
Farbstoff+Hyase-Quaddel nach 20'	233	121	43,1%	1,0%
Farbstoffquaddel nach 40'	172	106		
Farbstoff+Hyase-Quaddel nach 40'	217	371	59,0%	1,0%
Farbstoffquaddel nach 60'	176	53		
Farbstoff+Hyase-Quaddel nach 60'	267	46	8,2%	-

$$n = 7; \quad \chi_{\text{emp.}}^2 = 8,074; \quad p = 30\%$$

T a b e l l e 12
(Versuchsreihe 2)

	$\bar{x}$	s^2	Hyase-Hemmung
Farbstoffquaddel vor	178	26,7	
Farbstoff+Hyase-Quaddel vor	280	10,7	
Farbstoffquaddel nach 50'	179	46,7	
Farbstoff+Hyase-Quaddel nach 50'	280	53,3	0,6%

$$n = 3; \quad \chi_{\text{emp.}}^2 = 1,998; \quad p = 50\%$$

T a b e l l e 13
(Versuchsreihe 3)

	$\bar{x}$	s^2	Hyase-Hemmung
Farbstoffquaddel vor	185	302	
Farbstoff+Hyase-Quaddel vor	277	15	
Farbstoffquaddel nach 20'	186	240	
Farbstoff+Hyase-Quaddel nach 20'	270	69	7,6%
Farbstoffquaddel nach 50'	185	33	
Farbstoff+Hyase-Quaddel nach 50'	275	49	2,5%

$$n = 5; \quad \chi^2_{\text{emp.}} = 9,307; \quad p = 5\%$$

T a b e l l e 14
(Versuchsreihe 4)

	$\bar{x}$	s^2	Hyase-Hemmung
Farbstoffquaddel vor	153	68	
Farbstoff+Hyase-Quaddel vor	258	659	
Farbstoffquaddel nach 20'	150	186	
Farbstoff+Hyase-Quaddel nach 20'	255	238	3,4%
Farbstoffquaddel nach 50'	164	11	
Farbstoff+Hyase-Quaddel nach 50'	276	181	-17%

$$n = 5; \quad \chi^2_{\text{emp.}} = 10,396; \quad p = 5\%$$

T a b e l l e 15

Diskussion

In Ergänzung der eingangs aufgeführten Problematik zeigen die vorgelegten Untersuchungen, daß sich in unserer Versuchsanordnung die hyaluronidasehemmende Wirkung der Oestrogene am Beispiel des Oestronsulfates in vivo reproduzieren läßt. Vergleichsversuche mit Aqua bidest.-Injektionen lassen erkennen, daß die Hyaluronidasehemmung dem Oestronsulfat zugeschrieben werden muß und nicht Folge der Injektionsbelastung ist. Gleichzeitig bestätigen die Versuche mit Aqua bidest.-Injektionen die von W e i l h e l m i ³⁶ getroffene Feststellung, daß die Barbituratnarkose keinen Einfluß auf die Hyaluronidaseaktivität ausübt. Die Ergebnisse der Versuchsreihe 4 zeigen, daß die Hyaluronidasehemmung des Oestronsulfates durch Ergotamintartrat blockiert wird. Nach diesen Ergebnissen ist anzunehmen, daß auch oestrogenwirksame Substanzen ihre Hyaluronidasehemmung auf dem Wege über eine Aktivierung des Nebennierenmarkes ausüben. Sie stehen damit gleich mit anderen körpereigenen Hormonen, wie sie die Nebennierenrindenhormone darstellen, die nach den erwähnten Untersuchungen von M a t h i e s ⁶ und Mitarbeitern ebenfalls eine Wirkung über eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark bewerkstelligen. Wenn nach den erwähnten Versuchen von M a t h i e s und Mitarbeitern ^{27,28} eine Freisetzung von Heparin oder zumindest von heparinähnlichen Substanzen im Anschluß an eine Katecholaminwirkung angenommen wird, so zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, nach denen auch mit Protaminsulfat die Hyaluronidasehemmung nach Oestronsulfat blockiert werden kann, daß hier der gleiche Wirkungsmechanismus vorliegt. Es wird sogar eine geringe Steigerung der Hyaluronidaseaktivität im Protaminsulfat-Oestronsulfat-Versuch sichtbar, was vorläufig noch nicht sicher zu erklären ist.

Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurde die von Oestrogenen bereits beschriebene hyaluronidasehemmende Wirkung am Beispiel des Oestronsulfates im in-vivo-Versuch bei Ratten bestätigt. Ferner wurde gezeigt, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung des Oestronsulfates durch Ergotamintartrat als Adrenolyticum aufzuheben ist. Durch Protaminsulfat kann ebenfalls die hyaluronidasehemmende Wirkung des Oestronsulfates blockiert werden,

wobei sogar eine mäßige Steigerung der Hyaluronidaseaktivität sichtbar wird. Unter Zugrundelegung bereits vorliegender Ergebnisse wird diskutiert, daß auch Oestronsulfat als Vertreter oestrogenwirksamer Substanzen seine hyaluronidasehemmende Wirkung über eine Aktivierung des Nebennierenmarkes ausübt, wobei im Anschluß an eine Katecholamin-ausschüttung Heparin oder heparinähnliche Substanzen im Körper wirksam zu werden scheinen.

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H.: Med. Klin. 52 (1957), 1676
- 2) Mathies, H.: Arzneim.forsch. 8 (1958), 233
- 3) Mathies, H. u. Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35 (1957), 892
- 4) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 5) Mathies, H. u. Werther, G.v.: Arzneim.forsch. eingereicht
- 6) Mathies, H.: Zschr. f. ges. exper. Med. 131 (1959), 118
- 7) Mathies, H. u. Werther, G.v.: Zschr. angew. Bäder-Klimahk. 5 (1958), 503
- 8) Mathies, H.: Zschr. f. Rheumaforsch. eingereicht
- 9) Jankowski, A.: Diss. München 1957
- 10) Hartmann, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 11) Gerson, U.: Diss. München in Vorbereitung
- 12) Schlierf, G.: Diss. München in Vorbereitung
- 13) Rösch, U.: Diss. München in Vorbereitung
- 14) Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225 (1955), 14
- 15) Jung, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 16) Sayers, G. u. Sayers, M.: Endokrinology (Springfield) 40 (1947), 256
- 17) Mathies, H.: Ärztl. Forsch. 12 (1958), I/87
- 18) Mathies, H.: Arch. int. Pharmacodyn. et Ther. im Druck
- 19) Scheufele, R.: Diss. München 1958
- 20) Mathies, H.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol. eingereicht
- 21) Schmidt, D.: Diss. München in Vorbereitung
- 22) Vogel, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 23) Poulantzas, J.: Diss. München 1958
- 24) Lingnau, W.: Diss. München in Vorbereitung
- 25) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 26) Schlierf, G.: Diss. München in Vorbereitung
- 27) Mathies, H. u. Walcher, A.: in Vorbereitung
- 28) Maxein, H.: Diss. München in Vorbereitung
- 29) Schoen, R.: 9. Fortb.Kurs f. Ärzte, Regensburg Okt. 1952
- 30) Wattenberg, W.: Meeting Mayo Clinic 21 (1946), 26
- 31) Koch, W.: Monatsh. Tierheilk. 5 (1953), 28
- 32) Heim, E.: Fortpfl. Zuchthygiene u. Haustierbesamung 4 (1954), 5
- 33) Sprunt, D.H.: Amer. Rev. Tbc. 59 (1949), 185
- 34) Sprunt, D.H. u. Mitarb. J. exper. Med. 67 (1938), 159
- 35) Obal, A.: Ärztl. Wschr. (1950), 804
- 36) Wilhelmi, G.: zit. Domenjoz (14)

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. H. Mathies für die Anregungen zu dieser Arbeit und die Mit-
hilfe bei der Durchführung der Versuche. Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich
bin ich für die statistische Auswertung der Ergebnisse dankbar. Die
Versuchsmengen Oestroneulfat (Schering A.G.), Ergotamintartrat (Gynergen,
Sandoz A.G.) und Protaminsulfat (Deutsche Hoffmann La Roche A.G.)
wurden uns freundlicherweise von den Herstellerfirmen zur Verfügung
gestellt.

Ich, Alois Glück, bin geboren am 18.11.1933 in Kühbach Kreis Aichach in Oberbayern, als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Alois Glück und der Frau Auguste Glück, geborene Burger.

In der Zeit von 1948 bis 1953 besuchte ich das humanistische Gymnasium bei St. Stephan in Augsburg und legte dort im Juni 1953 die Reifeprüfung ab. Im selben Jahr, das heißt im Wintersemester 1953/54 begann ich das Medizinstudium in München. Unter meinen vorklinischen Semestern findet sich ein Auslandssemester in Wien. Nach dem Wintersemester 1955/56 brachte ich das Physikum hinter mich. Während der folgenden Semester studierte ich in München mit Ausnahme eines Semesters an der Medizinischen Akademie in Düsseldorf.

